

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

EMLŐS COCHLEABÓL IZOLÁLT KÜLSŐ SZŐRSEJTEK
OLDALFALÁNAK MEREVSÉGSZABÁLYOZÁSA ÉS A
COCHLEÁRIS ADAPTÁCIÓ

dr. Batta József Tamás

DEBRECENI EGYETEM ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM

ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR

FÜL-ORR-GÉGE ÉS FEJ-NYAK SEBÉSZETI KLINIKA

Témavezető: prof. dr. Sziklai István

2004

Bevezetés

Az emlős cochlea széles frekvencia-tartományban képes mind az igen alacsony, mind a kifejezetten magas intenzitású hangok érzékelésére. A cochlea sajátos felépítése következtében egy összetett mechanikai rendszert alkot, mely passzív mechanikai sajátságai önmagukban is alkalmassá teszik a hang frekvencia-specifikus érzékelésére. A longitudinális hangrezgések által kialakított hallócsontláncolati mozgások a perilymphán keresztül mozgásba hozzák a membrana basilaris-Corti-szerv-membrana tectoria által alkotott cochleáris hangfelfogó rendszert, mely eredményeként az alaphártyán transzverzális haladóhullámok jönnek létre. Ezen haladóhullámok amplitúdómaximuma azok frekvencia-specifikus helyén alakul ki a cochleán belül. A cochlea ilyen formán létrejövő passzív működése, melynek modelljét Békéssy dolgozta ki 1960-ban, azonban nem elegendő a hangérzékelés tényleges frekvenciafelbontásának és intenzitásszélességének eléréséhez. A cochlea speciális, mechanikailag aktív sejtjei, az un. külső szőrsejtek (OHC) a cochleát egy pontosan szabályozott, aktív hangérzékelő rendszerré alakítják, mely így képessé válik élettani feladatának a betöltésére.

A külső szőrsejtek felépítése, működése

A külső szőrsejtek jellegzetes, hengeres alakú, excentrikus magvú sejtek, melyek az emberi cochleában 3-4 sorban helyezkednek el a külső pillérsejtek és a Hensen-sejtek közötti térben, szinaptikus pólusukkal a Deiters sejtekre támaszkodva, ciliáris pólusukkal a membrana tectoriahoz illeszkedve. A külső szőrsejtek oldalfalának sajátos három rétegű felépítése van, mely a sejtmembránból, a hozzá un. pillér fehérjékkel kapcsolódó kortikális rácsozattól és az ehhez szorosan kötődő ciszternális rendszerből áll. A ciszternális rendszer a sejtsúcs és mag között elhelyezkedő sejtalkotó, mely a mag alatti régióban az un. szub-szinaptikus ciszternális rendszerben folytatódik. A kortikális rácsozat a citoskeletális rendszer részét képező, spektrin szálakkal összekötött, párhuzamos lefutású aktin szálakból felépülő váz, mely biztosítja a külső szőrsejtek hengeres alakjának megtartását és a sejt mechanikai stabilitását. A felszín alatti rácsozat pillérfehérjéi közötti ívesen feszülő plazmamembrán, a kapcsolódó aktin és spektrin filamentumok speciális szerkezeti egységeket alkotnak, melyek az oldalfal elektronmikroszkópos képén finom egyenetlenség, ráncoltság formájában jelennek meg. Ezek a mikromechanikai egységek felépítésükből adódóan egyrészt képesek a rugalmas energia tárolására ill. pufferelésére, másrészt képesek a membránpotenciál változását követő alakváltozásra is (un. membrane bending model,

Raphael et al. 2000). A külső szőrsejtek mechanikailag aktív sejtek, melyek un. gyors és lassú mozgásra képesek a sejt hossztengelyének megfelelően. A lassú szőrsejtmozgás különböző ingerekkel kiváltható, 20-60 másodperces idő intervallumba eső sejtkontrakció, mely feltételezett élettani szerepe a cochlea védelmében és az adaptációban lehet. A lassú szőrsejtmozgás molekuláris alapjai még nem tisztázottak, de a korábban említett mikromechanikai egységek feltehetően fontos szerepet játszanak benne.

A gyors szőrsejtmozgás ATP és calcium független, a sejtmembrán feszültségváltozásait követő sejthosszváltozás, mely elég gyors ahhoz, hogy követni tudja a hanghullámok által létrehozott alaphártya kitéréseket. A gyors szőrsejtmozgást (elektromotilitás) a sejtmembránban található, sűrűn elhelyezkedő speciális molekulamotor, az un. presztin alakváltozása hozza létre. Ez a transzmembrán fehérje egy módosult anion cserélő molekula, mely a membránpotenciál változására konformációváltozással reagál, s így a presztin molekulák membránpotenciál változás által szinkronizált kumulatív alakváltozása sejthosszváltozásban jelenik meg. A molekulamotor alakváltozásának sejtszintű mozgássá alakítását a citoszkeleton és a sejtmembrán által alkotott funkcionális „erőkifejtő egységek” un. mikrodoménok biztosítják. A gyors szőrsejtmozgást a szőrsejtek sztereociliumainak elhajlása nyomán kialakuló membránpotenciál változás vezérli, mely a hanghullámok alaphártyán kialakított kitérésével arányos. Ez az un. elektromechanikus transzdukció, mely a külső szőrsejtek membránpotenciálja, mint „nullpont” körül, a váltóáramú receptorpotenciál által kiváltott rövidülési és megnyúlási válaszoknak felel meg, oly módon, hogy hiperpolarizációra aktív megnyúlás, depolarizációra aktív rövidülés jön létre. Így a külső szőrsejtek feszültségfüggő sejtmozgását a hangrezgések által létrehozott alaphártya kitérések vezérik, mely élettani szerepe a membrana basilarisra történő megfelelő ütemben való aktív mechanikai energia-visszacsatolás. A hanghullám által létrehozott alaphártya kitérések fáziséval egyező ütemben történő mechanikai energiavisszacsatolás az alaphártya rezgések amplitúdómaximumát kiemelve biztosítja a hallásküszöb környéki hangérzékelést (cochleáris erősítő), míg az amplitúdó maximum környezetében ellenkező fázisban történő mechanikai energiavisszacsatolás révén kialakult aktív hullámhossz csökkentés („széli vágás”) lehetővé teszi a cochlea finom frekvencia felbontását. Így a külső szőrsejtek a cochleáris mechaika aktív sejtjeiként biztosítják az emlős hallószerv nagyfokú szenzitivitását és nagy felbontású frekvenciahangolását.

A sejtfalmerevség és szerepe

A külső szőrsejtek oldalfalának ultrastruktúráldása nyomán létrejövő sajátos, már említett mikromechanikai egységek (Raphael et al. 2000, membrane bending model) megteremtik egy, a motor molekuláktól független, az oldalfal merevségét szabályozó rendszer működésének szerkezeti alapját. A sejtfal merevségének megváltozásával megváltozik a motorfehérjék erőátviteli hatékonysága is, mivel a motor fehérjék a sejtfal által közvetített mechanikai ellenállással szemben dolgoznak.¹ Ily módon egy presztin-független sejtfalmerevség szabályozó rendszer lehetővé tenné a külső szőrsejtek membrana basilarisra történő, aktív energia visszacsatolásának önszabályozását.

A külső szőrsejtek merevségi viszonyait többen vizsgálták különböző mikrodeformációs technikákkal. Ezek közül néhány kísérlet az oldalfal merevségének vizsgálatára született, különböző sejtrégiókban történő részletes összehasonlító merevségvizsgálat azonban eddig még nem készült. Korábbi irodalmi adatok arra utalnak, hogy a külső szőrsejtek oldalfala mind húzó, mind nyomó erő hatására egyszerű rugalmas alakváltozással reagál, jóllehet ezek a közlemények csupán az adott erőbehatásra létrejött maximális alakváltozás mértékét vizsgálták,² dinamikus mikrodeformációs vizsgálatok nem történtek. Az oldalfal komplex felépítése azonban komplex mechanikai viselkedést feltételez, ezért fontos az oldalfal húzóerővel szembeni viselkedésének időfüggő (dinamikus) karakterizálása, mely lehetővé teszi egy esetleges aktív viselkedési komponens feltárását. Egy ilyen, motorfehérje független aktivitás megléte ugyanis a Corti-szerv dinamikus intrinsic adaptációs mechanizmusát bizonyítaná, melynek lehetőségét Fridberger és mtsai (1998) korábban felvetették.

A külső szőrsejtek efferens beidegzése

A külső szőrsejtek efferens rostjaikat a kontralaterális oliva superiorból kapják, a rostok a sejttesteken az un. szinaptikus régióban végződnek. Általánosan elfogadott, hogy a cochlea efferens beidegzése a cochleáris adaptáció és a tartós zaj elleni védelem fontos eleme. Ennek megfelelően az efferens rostok ingerlésének hatására csökken az otoacusticus emisszió nagysága. A külső szőrsejteken egyaránt végződnek olyan efferens neuronok melyek neurotransmitter anyaga az ACh és olyanok, melyeké a GABA. A külső szőrsejteken található ACh receptor a nikotinerg receptorcsaládba tartozó és un. $\alpha 9/\alpha 10$ ACh receptor, míg a γ -amino-vajsav receptor az un. GABA_A receptor. A cochleán belül ezek

¹elektromechanikus „kuplung”

²un. statikus merevség vizsgálat

a receptorok tonotopikus elrendeződést mutatnak: az ACh receptorok a cochlea bazális kanyarulatában helyezkednek el a legnagyobb számban, a cochlea csúcsa felé számuk folyamatosan csökken, míg a GABA receptorok száma a cochlea csúcsi kanyarulatában mutatja a legnagyobb sűrűséget, folyamatosan csökkenve a cochlea bázisa felé.

Az ACh megkötődése az $\alpha 9/\alpha 10$ ACh receptoron gyors Ca^{2+} beáramlást eredményez. A beáramló Ca^{2+} egyrészt Ca^{2+} -függő K^+ csatornák megnyílását eredményezi, mely következménye a K^+ kiáramlás hatására kialakuló hiperpolarizáció lesz, másrészt a szubszinaptikus ciszternális rendszerből Ca^{2+} -indukált Ca^{2+} felszabadulást idéz elő. Az így létrejött Ca^{2+} felszabadulás különböző foszforilációs folyamatokat indít el, mely a citoszkéletális elemek foszforilációjához vezet, mely képes lehet megváltoztatni a külső szőrsejtek mechanikai sajátságait. Dallos és mtsai (1997) a cochlea bazális kanyarulataiból izolált szőrsejteket vizsgálva azt találták, hogy ACh hatására a sejtek axiális merevsége jelentősen csökkent miközben a gyors sejtmozgás amplitúdója jelentősen növekedett. Az ACh által létrehozott változások strichninnel és Ca^{2+} megvonással felfüggeszthetők voltak. Az ACh cochleobazális sejtek elektromotilitására és tengely irányú merevségére gyakorolt hatásának vizsgálata során nyert eredmények arra utalnak, hogy Ca^{2+} -függő foszforilációs folyamatok fontos szerepet játszhatnak a külső szőrsejtek merevségszabályozásában. Az ACh által létrehozott hiperpolarizációhoz hasonló dózisfüggő reverzibilis membránpotenciál változás GABA esetén is megfigyelhető, ugyanakkor semmilyen vizsgálat nem történt a GABA sejt merevségre gyakorolt hatását tekintve, ennek megfelelően összehasonlító irodalmi adatok sem állnak rendelkezésre a két jelátvivő sejt merevségre gyakorolt hatásáról. Mivel a külső szőrsejtek működési hatékonysága a sejt merevségi tulajdonságaitól függ, az oldalfalmerevség szabályozásának vizsgálata közelebb vihet az elektromechanikus transzdukció szabályozásának és a cochleáris erősítő automatikus beállító mechanizmusainak megértéséhez. Ezért tartjuk szükségesnek az ACh és a GABA sejt merevségre gyakorolt hatásának cochleobazális és cochleoapikális localizációból izolált sejteken történő összehasonlító vizsgálatát.

A mikrodeformációs technika

A külső szőrsejtek merevségvizsgálata ún. mikrodeformációs technikákkal lehetséges, melyek során a külső szőrsejtek valamely mechanikai hatásra adott alakváltozását vizsgálják. Az így kialakult alakváltozás mértékéből meghatározható a sejt hosszanti ill. oldalfal merevsége. A mikrodeformációs technikák két csoportba sorolhatók, aszerint, hogy a külső szőrsejtek deformációját milyen módszerrel érik el. Ennek megfelelően vizs-

gálhatjuk a sejt nyomó erőre kialakult alakváltozását, mely során egy speciális mikro-erőmérőhöz kapcsolt üvegrúddal a sejtre gyakorolt nyomóerő által létrehozott alakváltozás mértékéből határozzuk meg a sejt merevségét. Ez a technika alkalmas a sejtek hosszanti és keresztirányú merevségének meghatározására is, a tényleges oldalfalmerevség mérésére azonban csak nagyon kis kitérések mellett alkalmas. A másik mikrodeformációs technika a sejtfal húzóerővel szembeni deformálódását méri, mely során a sejt oldalfalára mikropipettán keresztül ismert negatív nyomást csatolunk. Ebben az esetben a sejtfal merevségét a sejtfal pipettába való behúzódásának mértékéből határozhatjuk meg. Ezzel a technikával közvetlen módon csak az oldalfal merevségét tudjuk mérni, de a keresztirányú és hosszanti merevség közötti összefüggés alapján a hosszanti merevség számolható. A mikrodeformáció meghatározására mindkét technika a külső szőrsejtekről készült felvételek vizuális elemzését használja. Megfelelően pontos mérések csak megfelelő nagyítás és megfelelő feloldóképesség mellett lehetségesek. Ugyanakkor a sejtekről készített natív képeken a sejthatár nem különül el elég élesen a háttértől, ami a mérési eredmények nagy szórását és magas mérési hibát eredményez. Külön nehézséget jelent, hogy az üvegpipettába behúzott sejtfalrészlet kontrasztja tovább romlik a pipetta falán történő fényszóródás miatt. A sejtmembrán fluorescens jelölése jól elkülöníthető sejthatárt eredményez, de használata technikailag igen nehéz. A mikropipettán keresztül alkalmazott szívóerő által létrehozott mikrodeformációt vizsgáló eljárás legnagyobb előnye az, hogy alkalmas kis oldalfal szakaszok (patch-ek) elkülönített vizsgálatára.

1. Célkitűzések

1. A szakirodalomban korábban már leírt, a mikropipettán alkalmazott szívóerő által létrehozott mikrodeformáció mérésén alapuló oldalfalmerevség meghatározó módszer mérési pontosságának javítása egy digitális képfeldolgozó eljárás kidolgozásával, mely lehetővé teszi a sejthatár megfelelő identifikálását a mikroszkópos felvételeken.
2. A külső szőrsejtek oldalfalmerevségének összehasonlító vizsgálata a cochlea bazális és csúcsi kanyarulataiból elkülönítve izolált sejteken.
3. A cochlea bazális és csúcsi kanyarulataiból elkülönítve izolált külső szőrsejteken kis léptékű sejtfalmerevség térképezés elvégzése a sejt hossz tengelye mentén, valamint ennek összehasonlító vizsgálata a különböző cochleáris lokalizációjú sejteken.
4. A külső szőrsejtek oldalfalmerevségének dinamikus időfüggő vizsgálata, időkarakterisztikájának felvétele, az oldalfal mechanikai behatásra adott válaszána jellemzése.

5. Az efferens neurotranszmitterek hatásának összehasonlító vizsgálata a sejtfalmerevségre.
6. Az efferens neurotranszmitterek hatásának vizsgálata a sejtfalmerevség időkarakteristikájára.

Anyagok és módszerek

Sejtelőkészítés

A kísérletekhez pigmentált, fiatal, ép Preyer-reflexű, pentobarbitállal túlaltatott tengeri malacokat használtunk. A Corti-szerv kivétele után szobahőmérsékleten kollagenáz-emésztést alkalmaztunk (IV típus, Sigma, 1 mg/ml), mely után a külső szőrsejtek finom mechanikai behatással leválaszthatóvá váltak. A külső szőrsejteket a cochlea csúcsáról és alapjáról elkülönítve izoláltuk, mely eredményeként cochleobazális és cochleoapikális lokalizációból származó sejtpopulációkat kaptunk, $28,5 \pm 5 \mu\text{m}$ ill. $75 \pm 3 \mu\text{m}$ átlagos sejthosszal ($n=87$). A vizsgálatokhoz szabályos, hengeres alakú, nem granulált citoplazmájú sejteket választottunk melyek sejtmagja bazális helyzetű volt. Extracelluláris oldatnak a szabványos Hank féle külső oldatot használtuk, mely összetétele (mM-ban): 136,75 NaCl, 5,36 KCl, 0,34 Na_2HPO_4 , 0,44 KH_2PO_4 , 0,81 MgSO_4 , 1,26 CaCl_2 , 5,56 glükóz, 4,17 NaHCO_3 , 10 HEPES (pH 7,4, 300 mOsm/l). A kalciummentes külső oldatot a Hank oldat összetételének felhasználásával készítettük, azzal a különbséggel, hogy a kalciumot ekvimoláris magnéziummal helyettesítettük és az oldatot kiegészítettük 5mM EGTA-val.

A külső szőrsejtek mikroszkópos vizsgálata és a mikrodeformáció mérése

A méréseket külső oldattal töltött folyadékkamrában ($200 \mu\text{l}$) végeztük, inverz, fáziskontraszt mikroszkóp alatt, 400x nagyítás mellett. A sejtek fáziskontraszt képeit digitálisan rögzítettük. A rögzített képek digitális tisztítása, zajmentesítése után a jobb láthatóság elérésére pseudokolor átalakítást végeztünk: a különböző optikai sűrűségű sejtpartikulumok különböző szürkeárnyalatos képpontként való leképezése után a szürkeárnyalatos képpontokat meghatározott algoritmus szerint megfelelő -nem valóság- színnel jelölve pseudokolor képet nyertünk.

Az alkalmazott technikai eszközök

A sejtek Nikon TMS-F mikroszkóppal nyert fáziskontraszt képeinek digitális rögzítése Sony DXC-107P CCD-kamera segítségével IBM kompatibilis PC-hez csatolt külső digitalizáló kártyán keresztül (Pinnacle Systems, Inc. USA, California) történt, 24 bit-es színmélységet használva. (Az ehhez a folyamathoz használható számítógép minimum követelménye: 200MHz Pentium II MMX processzor, 32MB RAM, 4MB video RAM, 2GB IDE HDD.) Az adatalemzéshez használt számítógép 1.8 GHz Pentium IV processzort, 256 MB RAM-ot, NVIDIA GeForce-2 videokártyát és 20GB IDE HDD-t tartalmazott.

Az alkalmazott programok és a képanalizáló eljárás

A képdigitalizáláshoz a Pinnacle digitalizáló kártya saját szoftverét használtuk (Studio PCTV 1.00.2). A képfeldolgozáshoz és a pszeudokolor eljáráshoz saját fejlesztésű szoftvereket használtunk, melyek Turbo Pascal programnyelven íródtak. A képfeldolgozás első lépése az eredeti szürkeárnyaltos képek olvasása és egyedi fájlformátumba való konverziója. Ezt követi a képek különböző algoritmusok szerint való színekódolása.

A közvetlen színátalakítási eljárás során az algoritmus a képpontok szürkeárnyaltos skálán lévő kódjához közvetlenül hozzárendeli az ennek megfelelő VGA színekódot, így módon közvetlenül összekapcsolja a szürkeárnyaltos kódrendszert a VGA színskálával. Ennek az egyszerű algoritmusnak programkörnyezetbe való beültetése könnyen megoldható, hátránya, hogy az egyes szürkeárnyaltokhoz rendelt színt csak a VGA színskála standard felosztása határozza meg, így nem minden esetben különülnek el megfelelően az egymáshoz közel eső szürketónusú határvonalak.

A kis tónuskülönbségek kiemelésére alkalmas a képkivonásos eljárás, mely során az eredménykép két különböző kísérleti helyzetről digitalizált kép identikus pontjainak kivonásával jön létre, amit az eredménykép színekódolása követ. Ennek az eljárásnak az eredményeként a különböző kísérleti állapotok közötti különbségek kiemelhetők, ill. megjeleníthetők. Az eljárás speciális formája a háttérkivonásos módszer, mely során információt nem, csupán „vizuális zajt” tartalmazó háttérfelvétel képpontonkénti kivonása történik az információt tartalmazó képből. Az így végzett optikai zajmentesítést követően történik a színekódolás.

Az árnyalatkiemeléses eljárással tovább javítható a kontúrkiemelés. Az eljárás módot ad egy árnyalat tartomány előre meghatározott, a környezetből jól kiemelkedő színekóddal való ellátására ill. az adott árnyalattartomány színiegyenlítésére. Szűkebb tartományt választva, lehetőség nyílik az azonos, vagy közel azonos optikai sűrűségű sejtpartikulumok

környezetükből vagy a háttérből való kiemelésére.

Az eljárások egyedileg megválasztott kombinációjával optimális kontúrkiemelés és megfelelő láthatóság érhető el. Az eljárások kiválasztása individuálisan történt, a programparaméterek közvetlen beállításával. Az egyedi fejlesztésű programokat a Red Hat 8.0 linux-disztribúció xdosemu futtatási környezetében használtuk. (A Turbo Pascal nyelven írt programok legnagyobb előnye a platformfüggetlenség, mivel pascal fordítók egyaránt elérhetőek DOS, Windows, MacOS, Linux, Unix, SunOS, OS2 operációs rendszerek alatt.)

A képanalizáló eljárás tesztelése

A képanalizáló eljárás tesztelésére és kalibrálására a Farkas és Sziklai (2003) által leírt, mikroáramlás által kiváltott lassú szörsejtkontrakció detektálását használtuk.

A sejtkontrakció kiváltására kalibrált, kézzel vezérelt gravitációs mikroáramlásos rendszert használtunk, mely kiküszöböli az elektromechanikus pumpával működő rendszerek indítási lökéshulláma által keltett nem kívánatos hatásokat.

A perfúziós pipettákat Clark EC 15TF üvegapillárisból készítettük, $75 \pm 6 \mu\text{m}$ belső átmérővel. A pipettát polietilén cső segítségével műanyag csapon keresztül egy 2 cm^3 űrtartalmú nyitott műanyag tartályhoz csatoltuk, mely folyadékszintjét a mérésekhez használt, ismert térfogatú medence folyadékszintjére egyenlítettük ki, úgy, hogy a perfúziós pipettában sem kifelé, sem befelé irányuló áramlás ne legyen. Az egyensúlyi folyadékszint beállítása a duplex folyadékkamra második medencéjében történt, az áramlás láthatóvátételéhez fenol-vörös indikátort használtunk.

Az áramlási rendszer kalibrálásakor a folyadék rezervoár-ba ismert térfogatú folyadékot (20, 40, 60, 80, 100, 150, 200 μl) adagoltunk és megmértük a folyadékkamrában lévő folyadék térfogatát az áramlás megindulását követő 1., 2., 3., 4. és 5. perc végén.

A sejtkontrakció kiváltásához használt pipetta a sejtektől $50 \mu\text{m}$ távolságra került elhelyezésére, úgy, hogy szájadékának alsó széle a folyadékkamra aljához támaszkodjék, a sejttest közepére merőlegesen mutatva. A mikroperfúziós rendszer kalibrációs görbéinek felhasználásával (7. ábra) beállított különböző áramlási sebességek mellett megmértük a sejtek nyugalmi, majd 1 perc áramoltatás utáni hosszát a natív fáziskontraszt ill. pszeudokolor eljárással nyert képeken kontroll körülmények között és Gd^{3+} jelenlétében, majd az így nyert eredményeket összevetettük.

Az oldalfal merevségének vizsgálata

Az oldalfal merevségét az Oghalai és mtsa-i (1998) által korábban leírt, aspirációs mikrodeformációs technika adaptált változatával vizsgáltuk. Az ehhez szükséges mikropipettákat $2,8 \mu\text{m}$ -s belső átmérővel Clark EC 15 TF üvegkapillárisból készítettük 5 lépésű formálási programmal (Flaming/Brown Model P-87). Az extracelluláris oldattal feltöltött pipettákat a megfelelő, szabályozható negatív nyomás biztosítására egy vízszintes manométerhez csatlakoztattuk. Megelőző bemérő kísérletek után a vizsgálatokhoz $4\text{-}10 \text{ H}_2\text{O cm}$ ($0,39 \text{ nN}/\mu\text{m}^2$ - $0,98 \text{ nN}/\mu\text{m}^2$) közötti negatív nyomástartományt választottunk, mely tartományban az oldalfal három rétegű struktúrája a szakirodalom szerint is intakt maradt. A méréseket külső oldattal töltött folyadékkamrában végeztük, fáziskontraszt mikroszkóp alatt, oly módon, hogy a külső szörsejt oldalfalához illesztett pipettára kapcsolt negatív nyomás hatására a mikropipettába behúzódó oldalfalrészlet fáziskontraszt képeit CCD kamera segítségével PC-hez csatolt külső digitalizáló kártyán keresztül rögzítettük. A rögzített képek digitális tisztítása, zajmentesítése után a jobb láthatóság elérésére pszeudokolor átalakítást végeztünk (lásd fent), mely után $18 \text{ képpont}/\mu\text{m}$ képfelbontás alakult ki. A sejfalrészlet behúzódásának mértékét az alábbi módon határoztuk meg: az 1 számú vonal, melyet a mikropipettaszájadékának vetületére fektettünk, szolgált a viszonyítási pontnak. Az ezzel párhuzamos, az oldalfalrészlet görbületére merőlegesen fektetett 2 számú vonal és a viszonyítási vonal közötti távolságot tekintettük a pipettába betüremkedő oldalfalrészlet hosszának, melyből a merevségi mutatót (Sp-stiffness parameter) az alábbi összefüggést használva határoztuk meg:

$$S_p = -\Delta P \cdot r^2 \cdot \pi \cdot \Delta L \quad (1)$$

ahol ΔP ($\text{nN}/\mu\text{m}^2$) a pipettán keresztül applikált negatív nyomás; r (μm) a mikropipetta belső átmérője; ΔL (μm) a pipettába behúzódó oldalfalrészlet hossza.

Az alkalmazott negatív nyomás (ΔP) hatására kialakuló oldalfal behúzódás (ΔL) mértékének jellemzésére 30 másodperces, $4\text{-}10 \text{ H}_2\text{O cm}$ -s negatív nyomáspulzusokat alkalmaztunk a mikropipettán keresztül az oldalfalra 30 másodperces megszakításokkal. A pipettába történő oldalfal behúzódást (ΔL) a negatív nyomáspulzus végén határoztuk meg. Az oldalfal behúzódás karakterisztikájának jellemzésére állandó, $6 \text{ H}_2\text{O cm}$ -es negatív nyomást alkalmaztunk 2 perces időintervallumban, az oldalfal behúzódást 10 másodperces gyakorisággal határoztuk meg.

A vizsgálatokhoz a külső szörsejteket hossz tengelyük mentén az alábbi régiókra osz-

tottuk: infrakutikuláris vagy apikális régió, sejtközépi régió (az infrakutikuláris régiótól a sejtmag felső vonaláig), -mely magában foglalja a közvetlenül a sejtmag fölött elhelyezkedő szupranukleáris régiót-, valamint az infranukleáris régió, a sejtmag alsó élétől a szinaptikus pólusig terjedően. Ezeket a régiókat ugyanazon sejten, ugyanazt a pipettát használva vizsgáltuk.

Farmakológiai vizsgálatok

Az oldalfalmerevség szabályozásának vizsgálatához a presztinműködést gátló nátrium-szalicilátot és az ismert aspecifikus kationcsatorna blokkoló GdCl_3 -ot (Sigma) használtuk. Mindkét anyagot 5mM-os töménységben (ph 7,4, 300mOsm/l) az extracelluláris oldatban alkalmaztuk, úgy, hogy a külső szőrsejteket 10 percen keresztül tettük ki a hatásuknak (Chan és Ulfendahl 1999). Az efferens jelátvivők oldalfalmerevségre gyakorolt hatásának vizsgálatához ACh-t és GABA-t, ill. ezek specifikus gátlószereit (strychnin és bicuculin) használtuk, mindegyik anyagot 50 μM koncentrációban, 4 percen keresztül. A bicuculint oldékonysági tulajdonságai miatt első lépésben DMSO-ban oldottuk, majd ebből az 1mM-os törzsoldatból továbbhígítás során kaptuk a felhasznált oldatot. A DMSO végkoncentrációja a külső oldatban kevesebb mint 0,1% volt, mely a megelőző bemérő kísérletek során nem befolyásolta kimutatható mértékben az oldalfal viselkedését (nem ábrázolt adatok). Az oldalfal merevségét állandó, 6 H_2O cm-es negatív nyomással vizsgáltuk 2 perces időintervallumban a behatás előtt és 2 perces időintervallumban a behatási idő végén. Egy sejtet csak egy tesztoldattal vizsgáltunk.

Adatfeldolgozás, statisztikai analízis

A kísérleti adatokra illesztett modellszabványokat és modell paramétereket a Gnuplot nevű, programozható illesztőprogram segítségével nyertük, a statisztikai számításokat a SalStat ill. SigmaStat nevű statisztikai programmal végeztük. A Gnuplot és a SalStat program GNU GPL liszenc alatt áll. Annak ellenőrzésére, hogy a különböző állatokból nyert sejtek azonos módon viselkednek-e, a merevségi mutatót (1. egyenlet) és a feszesség beállító sejtválaszt (regulatory stiffness response, lásd később) jellemző modell paramétereket meghatároztuk (5. egyenlet) 5 különböző állatból izolált, összesen 27 sejten és ANOVA variancia analízisnek vetettük alá, mely alapján a különböző állatokból nyert sejtek viselkedése gyakorlatilag nem különbözik ($p > 0,5$), így a különböző állatokból izolált sejteken végzett mérések egymással összevethetők. A statisztikai szempontból független

csoportok statisztikai vizsgálata kétmintés t-próbával, a különböző kezelések hatásának statisztikai vizsgálata ANOVA és Dunnett szerinti kontrollcsoportokhoz történő többszörös viszonyítási eljárással történt (szignifikanciaszint $p=0,05$). Az ACh és GABA jelenlétében a modell paraméterekben észlelt változások százalékban (%) kerültek megadásra a jobb áttekinthetőség érdekében. Az 5. egyenlet felhasználásával egyenként kerültek illesztésre a kísérletben résztvevő sejtek mérési eredményei, (vizsgálati csoportonként 10 sejt) az így számolt modell paraméterek átlagából került meghatározásra a százalékos változás: $[(\text{átlag}-\text{átlag}_{\text{kontroll}})/\text{átlag}_{\text{kontroll}}]\times 100$. A megadott szórásokat a Gauss féle hibaterjedési függvény felhasználásával határoztuk meg. Hasonlóképpen jártunk el a feszülés indukálta lassú sejtösszehúzódás esetében is.

Eredmények

A képanalizáló és pseudokolor eljárás hatékonysága

Az optikai rendszer magas kontrasztot adó, ismert méretű próbatesten végzett kalibrálása során 18 képpont/ μm felbontás adódott, ami azt jelenti, hogy az elemzésre kerülő képeken 1 képpont 0,055 μm távolságnak felel meg. A pseudokolor eljárás lehetővé teszi, hogy az élő sejtek gyenge kontrasztot adó sejthatárai pontosan elkülöníthetők legyenek. A mikropipettába behúzódott oldalfalrészlet határai a pipetta anyagának optikai aktivitása következtében lényegesen halványabban, elmosódottan ábrázolódnak a fáziskontraszt képeken. A pseudokolor eljárás alkalmazása után a behúzódott oldalfalrészlet határai is jól azonosíthatóvá válnak.

Az eljárás alkalmazhatóságát mikroáramlás által kiváltott lassú szőrsejtkontrakció detektálásával ellenőriztük, melyhez első lépésben a mikroperfúziós rendszer kalibrációja történt. Ennek során azt találtuk, hogy a mikroperfúziós rendszer a 0-5 perces időintervallumban lineáris kiáramlást, ill. időben állandó áramlási sebességet biztosít, függetlenül a gravitációs tartályra terhelt folyadéktérfogattól. Az áramlási sebesség és a gravitációs tartályra terhelt folyadékmennyiség exponenciális összefüggésben áll. A kalibrációs görbék felhasználásával 0,6-2,1 $\mu\text{l}/\text{perc}$ áramlási sebességi tartományban jól kontrollálható, alacsony áramlású mikroperfúziós rendszer jön létre.

A mikroáramlás által kiváltott reverzibilis lassú szőrsejtkontrakció pseudokolor képelemzési eljárással való detektálása során a korábbi irodalmi adatoknak megfelelően lineáris összefüggést találtunk az áramlási sebesség és a sejtösszehúzódás között. A natív fázis-

kontraszt képeken végzett mérésekhez képest a pszeudokolor képelemzéssel nyert eredmények szórása jelentősen alacsonyabb ($\sim 20\%$), az eljárás nem növelte meg jelentősen a feldolgozáshoz szükséges időt. A nem-szelektív kation csatorna blokkoló Gd^{3+} (5 mM) alkalmazása jelentősen csökkentette a mikroáramlás indukálta sejtkontrakciót, függetlenül attól, hogy natív fáziskontraszt, vagy pszeudokolor eljárással átalakított képek elemzésével végeztük a méréseket. Az átalakított képeken végzett mérések azt mutatják, hogy a Gd^{3+} jelenlétében a mikroáramlás indukálta sejtkontrakció lineáris karakterisztikája megmarad, csak az illeszthető egyenes meredeksége változott a kontroll körülmények között észlelhető 1,98-ról 0,51-re (regressziós koefficiens $r_{\text{kontroll}}=0,98$; $r_{\text{Gd}^{3+}}=0,65$). Ezzel szemben a natív képek elemzésével nyert adatok viszont nem mutatnak statisztikailag kimutatható összefüggést. Ennek alapján elmondhatjuk, hogy a pszeudokolor eljárás mellett, hogy hatékonyan csökkenti a mikrodeformáció vizsgálatának mérési hibáját, lehetővé teszi nagyon kicsi változások megfelelő detektálását is.

A külső szőrsejtek oldalfal merevségének jellemzése a különböző sejtrégiókban

A negatív nyomáspulzus végén meghatározott pipettába történő oldalfal behúzódnást (ΔL) ábrázolva az alkalmazott negatív nyomás függvényében -más szerzőkhöz hasonlóan- jól illeszkedő lineáris összefüggést találtunk ($r=0,91$; $p<0,001$) a negatív nyomás mértéke és az ennek hatására kialakuló sejtfalbehúzódnás között (ΔL - ΔP), függetlenül a sejtrégiótól. A különböző sejtrégiókban végzett mérések során azt találtuk, hogy az oldalfal merevsége (S_p) $1,83 \pm 0,13$ nN/ μm és $1,14 \pm 0,16$ nN/ μm , (átlag $\pm$ SD) közötti tartományban változik az apikális és szinaptikus pólus között. Az oldalfal merevsége az infrakutikuláris régióban a legnagyobb, a sejtközépi régióban csökken és az infranukleáris régióban a legkisebb.

A cochlea különböző régióiból izolált külső szőrsejtek oldalfal-merevsége

A külső szőrsejtek oldalfala merevségének feltérképezése során a 6 H₂O cm-s negatív nyomás mellett kialakult oldalfalbehúzódnást vizsgáltuk. A cochleoapikális sejtek esetében az oldalfal-behúzódnás az első ~ 12 μm -n közel állandó, majd folyamatos emelkedést követően ismét állandó végig a sejtközépi régióban a sejtmagig, végül a mag alatti szinaptikus régióban ismét megnövekszik.

A sejtmagnak megfelelő oldalfalszakasz merevségi mutatóját nem tudtuk meghatározni az általunk alkalmazott módszerrel, mivel ezen terület fokozott merevsége miatt a kialakuló oldalfalbehúzódnás túl kicsi ahhoz, hogy az a képelemzések során megfelelően azonosítható legyen. A 6 H₂O cm-s negatív nyomás mellett kialakult oldalfalbehúzódnás állandónak bizonyult a szinaptikus régió teljes területén, a számított merevségi mutató ebben a régióban volt a legkisebb a vizsgált régiók közül. A szívóerő hatására kialakuló oldalfal behúzódnás hasonló hosszanti elrendeződést mutat mind a cochleoapikális mind a cochleobazális régióból izolált sejtek esetében, beleértve a nem ábrázolt részeket is, azaz a különbséggel, hogy a rövidebb cochleobazális sejtek esetében az azonos merevségű szakaszok hossza is arányosan rövidebb.

Az oldalfal merevség húzóerővel szembeni időfüggő karakterisztikája

Az oldalfal behúzódnás időfüggvénye (ΔL - ΔT) a szupranukleáris régiókban azonos karakterisztikát mutat, a különböző oldalfal merevségű pozíciókban a görbék között csak kvantitatív eltérés észlelhető. Ugyanakkor a szinaptikus régióban felvett ΔL - ΔT görbe kvalitatív különbséget mutat a szupranukleáris régiók görbéihez képest. A szinaptikus régióban a ΔL - ΔT görbe egy egyszerű exponenciális függvénnyel leírható, míg a szupranukleáris régiókból nyert görbék tartalmazznak egy szigmoid komponenszt a negatív nyomás applikálása utáni 30 és 60 másodperc közötti időintervallumban (feszesség beállító sejtválasz-regulatory stiffness response). A negatív nyomás oldalfalra való applikálása ezen kívül indukál egy, a szigmoid komponens megjelenésével szimultán zajló, Boltzmann függvénnyel jól leírható lassú szörsejtmozgást is, melynek legnagyobb sebessége $\sim 0,03 \mu\text{ms}^{-1}$. Mindkét jelenségre igaz, hogy nem mutatható ki szignifikáns kapcsolat az intenzitásuk és a sejthossz között.

A lassú sejtválasz kalcium mentes külső oldatban való inkubálás során eltűnik ($n=10$, nem ábrázolt adatok), miközben a nyugalmi oldalfal merevség ($1,35 \text{ nN}/\mu\text{m}$) szignifikánsan megemelkedik ($1,99 \text{ nN}/\mu\text{m}$) ($p < 0,003$). Ugyanakkor a ΔL - ΔT görbén megfigyelhető egy jelzett töréspont az 50 másodperces mérési pontnak megfelelően, mely a normális kalciumtartalmú közegben észlelhető aktív oldalfal-válasz megjelenési pontja. Az infranukleáris régióban a ΔL - ΔT görbe kalcium elvonás mellett is megtartja az eredeti viselkedését.

Mivel a kalcium mentes külső oldatban a kalciumot magnéziummal helyettesítettük, kontroll kísérleteket végeztünk a Mg^{2+} oldalfalmerevségre gyakorolt hatását tekintve, mely

során azt találtuk, hogy a külső oldat Mg^{2+} koncentrációjának változtatása nem okozott kimutatható változást a külső szőrsejtek oldalfalának merevségében. A merevségi mutató $1,35 \pm 0,23 \text{ nN}/\mu\text{m}$ volt a normál külső oldatban ($0,81 \text{ mM } Mg^{2+}$) és $1,27 \pm 0,2 \text{ nN}/\mu\text{m}$ volt a 2 mM koncentrációjú Mg^{2+} -t tartalmazó oldatban ($n=10$).

A külső szőrsejtek oldalfalának húzóerőre adott passzív választ leíró modell

A szívóerő hatására mikropipettába behúzódó oldalfalrészlet hosszának időfüggése (L_t) az alábbi modell segítségével írható le: A kortikális rácsozat két pillérfehérjéje közé eső plazmamembrán és a hozzá kapcsoló citoskeletális elemek speciális rugalmas egységeket alkotnak, mely rugalmas egységnek két állapota van, egy nyugalmi és egy, az adott erőbehatásra kialakuló megnyúlási állapota. A két állapot közötti átalakulás egyirányú, elsőrendű kinetikát követ. Amennyiben a negatív nyomás oldalfalra való applikálása előtt ($t=0$) a rugalmas egységek nyugalmi állapotban vannak, a pipettába behúzódott oldalfalrészlet hosszának változása az idő függvényében (L_t) :

$$L_t = a \cdot (1 - e^{-b \cdot t}) \quad (2)$$

ahol a az oldalfal maximális megnyújthatósága [a rugalmas egységek számának (N_0) és az adott negatív nyomásértékhez tartozó egyensúlyi hosszának (l) szorzata], b a rugalmas egységek megnyúlási sebességi állandója és e az un. természetes szám.

Figyelembe véve, hogy az oldalfal a pipetta szájadékához nem tapad tökéletesen, számolnunk kell azzal, hogy a szívó erő hatására az oldalfal nagyon lassan becsúszhat a pipettába (sliding), magával vonva a felszín alatti ciszternális rendszert és a citoszol egy részét. Így a pipettába behúzódó oldalfal részlet hosszának időfüggése csak passzív mechanikai választ feltételezve:

$$L_t^* = a \cdot (1 - e^{-b \cdot t}) + m \cdot t + k \quad (3)$$

ahol m : az un. csuszamlási tényező (sliding modulus), k : viszkozitási együttható, t : az idő, a , e , b , mint fent.

A kísérleti adatok ezen modellel való matematikai illesztésével meghatározható a csuszamlási tényező mely átlagosan $0,00022 \mu\text{m/s}$, ami a vizsgált 120 másodperces időintervallumban az oldalfal $0,026 \mu\text{m}$ -es becsúszását eredményezi a mikropipettába $6 \text{ H}_2\text{Ocm}$

negatív nyomás mellett.

A külső szőrsejtek oldalfalának húzóerőre adott aktív viselkedésének modellezése

A kortikális rácsozat két pillérfehérjéje közé eső plazmamembrán és a hozzá kapcsoló citoszeletális elemek alkotta egységek nemcsak rugalmas egységekként, hanem elemi motoros egységekként is képesek működni (elaszto-motoros egység). Ennek megfelelően a ΔL - ΔT görbén megjelenő szigmoid komponenst a pipettába beszívott oldalfal elaszto-motoros egységeinek aktív összehúzódásaként modelleztük. A modellünk azon a feltevésen alapul, hogy a pipettába való beszívás következtében a sejtfalban kialakult mikrodeformáció által létrehozott fizikai feszülés (σ) un. feszülés-kapuzott (stretch-gated) ioncsatornákat aktivál, és a következményes Ca^{2+} beáramlás vezet az elaszto-motoros egységek összehúzódásához.

Az oldalfal feszülésének időfüggése $[\sigma(t)]$, mely szabályozhatja a feszülés kapuzott csatornák aktivitását, az alábbiak szerint írható le:

$$\sigma(t) = \frac{F_f}{A} = \frac{F_h - M \cdot \frac{[a \cdot (1 - e^{-b \cdot t}) + m \cdot t + k]}{t^2}}{A} \quad (4)$$

ahol F_f a feszülést létrehozó feszítő erő, F_h a negatív nyomás által közvetített húzóerő, M a behúzott oldalfal részlet tehetlenségi momentuma, A pedig a behúzott oldalfal részlet felülete.

Tekintve a húzóerő (F_h) és az behúzott oldalfal részlet hosszának nagyságát ($\sim 3 \times 10^{-9}$ N ill. $\sim 2 \times 10^{-6}$ m) a feszülés időfüggése egy alacsony emelkedésű exponenciális görbével írható le, mely jól közelíthető egy egyenessel a mikropipetta-aspiráció 0-120 másodperces időtartama alatt. Figyelembe véve a fizikai feszülés időfüggését, és az ioncsatornák igen rövid aktiválódási idejét, az aktiválódott elaszto-motoros egységek számának időfüggését egy Boltzman függvénnyel írhatjuk le. Ennek megfelelően a szupranukleáris régiók ΔL - ΔT görbéi az alábbiak szerint írható le:

$$L_c^*(t) = a \cdot (1 - e^{-b \cdot t}) - \frac{c}{1 + e^{-\frac{t - t_0}{d}}} + m \cdot t + k \quad (5)$$

ahol c : a behúzott oldalfal-szegmens maximális aktív retrakciója; d : az oldalfal-szegmens retrakciójának sebességi állandója; t_0 : a folyamat féléletideje.

A szalicilát és a Gd^{3+} hatása a külső szőrsejt oldalfalának aktív és passzív viselkedésére

A szalicilát közismerten gátolja a külső szőrsejtek presztinhez kötött (gyors) motilitását. Annak ellenőrzésére, hogy az oldalfal fent leírt aktív válasza független-e a presztin működésétől összehasonlítottuk az oldalfal húzóerővel szembeni időfüggő karakterisztikáját ($\Delta L/\Delta t$ görbék) kontroll körülmények és szalicilát jelenlétében. Ennek során azt találtuk, hogy szalicilát jelenlétében (5mM n=10) sem a $\Delta L/\Delta t$ görbék aktív, sem a $\Delta L/\Delta t$ görbék passzív karakterisztikája nem változott meg szignifikánsan (nem ábrázolt adatok). Kationcsatornák oldalfalmerevség szabályozásban betöltött szerepének vizsgálatára egy nem specifikus kation csatorna blokkoló anyagot, Gd^{3+} -t (5mM, n=10) adtunk az inkubáló oldathoz. Miközben a Gd^{3+} gátolta a negatív nyomás kiváltotta sejtrövidülést (a maximális sejttösszehúzódás mértéke $0,85 \pm 0,23$ -ról $0,5 \pm 0,18$ -re változott; n=10) látható, hogy Gd^{3+} hatására többrétű változás jött létre a $\Delta L/\Delta t$ görbén is. A legfontosabb változás az aktív merevség szabályozás jelentős csökkenése, melyet a 30-60 másodperc közötti szigmoid görbekomponens (lásd fent) „elsimulása” jelez. Az oldalfal passzív viselkedése is megváltozott, ami a görbe y-tengely mentén való lefelé tolódásában nyilvánul meg. A korábban részletezett matematikai modellünk lehetőséget ad arra, hogy egyrészt különválassuk a Gd^{3+} hatását az aktív és a passzív oldalfalviselkedésre, másrészt meghatározzuk ill. elemezzük ezeket a változásokat. Az így meghatározott, oldalfalviselkedésre vonatkozó mutatók mindegyike szignifikánsan különbözik a kontroll körülmények között meghatározott mutatóktól. A mutatók változásának iránya megegyezik a mutatók Ca^{2+} megvonás hatására kialakult változásának irányával, a Gd^{3+} hatása azonban elmarad a Ca^{2+} megvonás hatásától.

Az ACh és GABA hatása a cochlea különböző helyeiről izolált külső szőrsejtek oldalfalmerevségére

Kontroll körülmények között nincs szignifikáns különbség a cochleobázisról és a cochleacsúcsról izolált sejtek oldalfalmerevsége között (kétmintés t-próba, $p=0,7$). Az ACh (50 μ M) és GABA (50 μ M) oldalfalmerevségre gyakorolt hatása függ a külső szőrsejtek cochleán belüli elhelyezkedésétől. Az oldalfal merevsége szignifikánsan lecsökkent amikor ACh-t adtunk a cochlea bázisáról izolált sejtekhez, ugyanakkor a GABA hatástalan volt ugyanezen sejtcsoporton (ANOVA és Dunnett eljárás $p<0,05$). Hasonló statisztikai össze-

hasonlítását végezve a cochlea csúcsáról nyert sejtek esetében látható, hogy a GABA szignifikánsan csökkentette a sejtfalmerevséget, míg az ACh hatása statisztikailag nem bizonyult szignifikánsnak. Az ACh cochleobazális sejteken észlelt oldalfalmerevségre gyakorolt hatása és a GABA cochleoapikális sejteken észlelt oldalfalmerevségre gyakorolt hatása között nem észlelhető szignifikáns különbség (Dunnett eljárás, $p > 0,05$). Nem volt szignifikáns oldalfalmerevség változás amikor $50\mu\text{M}$ strychnint, a külső szőrsejteken található $\alpha 9$ ACh receptor specifikus gátlószerét adtuk az ACh mellé cochleobazális sejtek esetén vagy amikor $50\mu\text{M}$ bikukullint, az ismert GABA_A receptor blokkolót használtunk a GABA mellett cochleoapikális sejtek esetén (Dunnett eljárás, $p > 0,05$)

Az ACh és a GABA hatása az oldalfal merevségének aktív és passzív időfüggő változásaira

A külső szőrsejtek oldalfalmerevségének mikropipettán keresztül ható húzóerő hatása alatt kialakult változás a mikropipettába behúzódott oldalfal szegmens hosszának időfüggésével jellemezhető ($\Delta L - \Delta T$; 1. egyenlet). A mikropipettába behúzódó oldalfalszegmens $\Delta L - \Delta T$ függvényén látható jellegzetes, a 30 és 60 másodperc közötti időintervallumban megjelenő változás, a feszesség beállító sejtválasz megemeli az oldalfal merevségét. Az ACh és GABA $\Delta L - \Delta T$ függvényre gyakorolt hatása szoros összefüggést mutat a külső szőrsejtek cochleáris helyzetével.

Az ACh és GABA oldalfalmerevség szabályozásra gyakorolt hatása a $\Delta L - \Delta T$ függvényt leíró modell felhasználásával (5. egyenlet) nyert modell paraméterek elemzésével lehetséges. A modell paraméterek meghatározása a mérési pontok modell függvényével való sejtenkénti illesztése utáni átlagolással történt, 10 sejtet használva minden csoportban. Az ACh hatására az oldalfal maximális megnyújthatósága (a) $50 \pm 12\%$ -al ($n=10$), a mikropipettába behúzott oldalfal szegmens maximális aktív retrakciója (c) $85,5 \pm 17\%$ -al ($n=10$) míg a mikropipettába behúzott oldalfal szegmens retrakciójának sebességi állandója (d) $59,3 \pm 20\%$ -al ($n=10$) megnőtt, miközben az ACh szignifikánsan csökkentette az oldalfal merevségét ($18,9\%$ -al, lásd 3. táblázat) a cochlea bazális kanyarulatából izolált sejteken (átlagos sejthossz $31 \pm 5\mu\text{m}$). A GABA, hasonlóan az ACh-hoz fokozta az oldalfal maximális megnyújthatóságát (a) ($33 \pm 13\%$, $n=10$), a mikropipettába behúzott oldalfal szegmens maximális aktív retrakcióját (c) ($47,6 \pm 12\%$, $n=10$), valamint a mikropipettába behúzott oldalfal szegmens retrakciójának sebességi állandóját (d) ($24,5 \pm 16\%$, $n=10$) míg az oldalfal merevséget csökkentette $15,4\%$ -al (lásd 3. táblázat), a cochlea csúcsi kanyarulatából izolált külső szőrsejteken (átlagos sejthossz $76 \pm 4\mu\text{m}$). Mind az ACh,

mind a GABA oldalfalmerevség szabályozásra gyakorolt hatása felfüggeszthetők specifikus gátlószerekkel, sztrichninnel és bicucullinnal.

ACh és GABA hatása a külső szőrsejtek oldalfalának mikrodeformációja által kiváltott lassú sejtrövidülés karakterisztikájára

A külső szőrsejtek oldalfalára mikropipettán keresztül adott negatív nyomás által létrehozott mikrodeformáció lassú szőrsejt rövidülést hoz létre. Kontroll körülmények között nincs kimutatható különbség a cochleoapikális és cochleobazális sejtek mikrodeformáció hatására adott sejtrövidülési válasza között 6 H₂O cm negatív nyomás alkalmazása mellett. A mikrodeformáció keltette sejtrövidülés a cochlea bázisáról izolált sejtek esetében $87,7 \pm 19\%$ -al nőtt ACh jelenlétében, míg GABA jelenlétében $64,6 \pm 18\%$ -os növekedés ($n=10$) volt látható a cochlea csúcsáról izolált sejtek esetén (az ACh és a GABA önmagában nem okozott sejtrövidülést). A sejttöszszezűződás sebességi állandója nem változott GABA hatására, szemben az ACh hatására kialakult $42,8 \pm 12\%$ -os sebességi állandó növekedéssel ($n=10$), (16. ábra).

Az ACh és a GABA hatásának változása külső Ca²⁺ megvonás mellett

Mint korábban láthattuk, a külső Ca²⁺ megvonás jelentősen növelte a külső szőrsejtek oldalfalának merevségét (3. táblázat), emellett drasztikusan csökkent a feszesség beállító sejtválasz. Mivel Ca²⁺ tartalmú kontroll közegben mind az ACh mind a GABA hatása a feszesség beállító sejtválasz fokozása volt, megvizsgáltuk, hogy az extracelluláris Ca²⁺ megvonása milyen hatással van a jelenségre. ACh és GABA jelenléte mellett Ca²⁺ mentes környezetben a feszesség beállító sejtválasz megtartott, mindazonáltal a folyamat nagysága jelentősen csökkent a Ca²⁺ tartalmú kontroll közegben észlelhetőhöz képest. A mikropipettába behúzott oldalfal-szegmens maximális aktív retrakciója (c paraméter, lásd 5. egyenlet) ACh ill. GABA jelenlétében Ca²⁺ mentes környezetben $52,2 \pm 17\%$ -os ill. $53,1 \pm 17\%$ -os csökkenést mutatott a normál Ca²⁺ tartalmú környezetben kapott értékekhez képest ($n=10$).

Megbeszélés

A külső szőrsejtek oldalfalának összetett felépítése speciális mechanikai tulajdonságok megjelenését eredményezi és lehetővé teszi, hogy mechanikai szabályozás alatt tartsa a külső szőrsejt aktivitást. Mivel a motor fehérjék a sejtfal által közvetített mechanikai ellenállással szemben dolgoznak, az oldalfal merevség általunk leírt regulációja képes szabályozni a külső szőrsejtek elektromotilitását. Ebben felthetően a szubkortikális rácsozat játssza a legfontosabb szerepet, mely a plazmamembrán citoplazmatikus felszínéhez és a citoplazma felszín alatti ciszternális rendszeréhez szorosan kötődő, körkörös kereszt-kötésekkel összefogott hosszanti párhuzamos aktin szálakból felépülő szerkezetéből adódóan speciális mikrodoméneket alkot. Ezen mikrodomének speciális szerkezete teszi lehetővé a sejtmembránban elhelyezkedő, egymástól függetlenül aktiválódó elemi, feszültség függő motor fehérjék alakváltozásának kumulációját és átalakítását hosszirányú sejtmozgássá. Az így felépült citoskeletális rendszer rugalmas előfeszített állapotot tart fenn, mely a sejtek nyugalmi mechanikai ellenállását adja.

A külső szőrsejtek oldalfalának mikropipettán kersztül alkalmazott negatív nyomásra adott megnyúlás-erő válasza az oldalfal szerkezetének megfelelően rugalmas alakváltozásként jellemezhető, függetlenül attól, hogy melyik sejtrégióban vizsgáljuk.³ Mindazonáltal az oldalfal merevsége a sejt hossz tengelye mentén változó. A kísérletek során mind a cochlea alapjáról, mind a csúcsáról izolált külső szőrsejtek esetében hasonló, a sejt alapjától a sejt csúcsa felé irányuló oldalfalmerevség gradiens volt észlelhető. Így merevségazonos régiók alakulnak ki, melyeknek a sejt hosszához viszonyított relatív helyzete azonos a sejttest mentén. Ennek megfelelően a különböző hosszúságú sejtek megfelelő pozíciójú oldalfalszegmenseinek azonos Young modulusa lesz, és ezek az azonos rugalmassági tulajdonsággal rendelkező oldalfalszegmensek a sejtek azonos hányadát teszik ki mind a cochlea alapjáról izolált igen rövid, mind a cochlea csúcsáról izolált igen hosszú sejtek esetében is. Mivel a sejthossz a cochlea csúcsa felé haladva növekszik, az merevségazonos sejtfalszegmensek abszolút hosszai is növekednek a sejthosszváltozással együtt. Így a hosszabb (cochleoapikális) külső szőrsejtek arányosan hosszabb merevségazonos hengerszeletekből épülnek fel, mint a rövidebb (cochleobasalis) külső szőrsejtek, miközben a megfelelő hengerszeletek Young modulusa azonos, vagyis a különböző cochleáris lokalizációban elhelyezkedő külső szőrsejtek sejthosszának különbözősége nem jár a sejt mechanikai struktúrájának torzulásával. Az Euler féle rúd elmélet, mely szerint egy rugalmas hengerrúd

³statikus vizsgálattal, mely során az adott erőbehatásra kialakult maximális megnyúlást mérjük, a húzóerő applikálását követő, egy adott pillanatban

tengely szerinti merevsége és a hossza fordítottan arányos, magyarázatot ad arra, hogy hogyan teszi lehetővé a külső szőrsejtek fent leírt felépítése a korábbi vizsgálatok során észlelt hosszabb külső szőrsejtekhez tartozó kisebb, ill. rövidebb sejtekhez tartozó nagyobb (kumulatív) axiális merevség kialakulását. ⁴

A sejtfalmerevség vizsgálatához használt, mikropipettán keresztül alkalmazott negatív nyomással végzett mikrodeformációs vizsgálat során azonban a külső szőrsejtek oldalfalának aktív viselkedése figyelhető meg, melyhez szorosan kötődik egy ezzel a jelenséggel szinkron lezajló lassú sejtrövidülés. Az alkalmazott negatív nyomás következtében létrejött aktív sejtválasz kiváltója feltehetően az oldalfal megnyúlása, mely hasonló hatással lehet, mint egy hossz tengely irányú excesszív sejtmegnyúlás, ami kialakulhat egy erős akusztikus behatás nyomán megjelenő intenzív alaphártya kilengés kapcsán is. Ez, a mikrodeformációs kísérletek során megjelenő aktív sejtrövidülés és az oldalfal aktív viselkedése nem magyarázható a külső szőrsejteken korábban leírt egyszerű, ún. mechanoelektromos jelenséggel, mely során a sejtfal megnyúlása hyperpolarizációt, összenyomása pedig depolarizációt okoz. Mivel a külső szőrsejtek membránpotenciáljának megváltozása sejthosszváltozásként jelenik meg és a mikropipettába behúzódtott oldalfal megnyúlása hiperpolarizációt okoz, ennek következménye a motilis egységek mechanikai relaxációja lenne, ami a sejt megnyúlását kellene, hogy okozza, az oldalfal aktív retrakciója nélkül. A presztinhez, mint motorfehérjéhez kötött membránpotenciál függő sejthosszváltozást elsődlegesen a hang által rezgésbe hozott membrana basilaris kitérései ill. a kitérés frekvenciája vezérli, de szükségszerű, hogy tisztázzuk ennek a folyamatnak a mikropipettán keresztüli aspiráció által létrehozott mikrodeformáció keltette sejtválaszban betöltött szerepét. A presztinhez kötött sejtválasz szalicilát szenzitív folyamat, ellenben a mikrodeformáció indukálta lassú sejtrövidülés és oldalfalmerevség fokozódás Gd^{3+} szenzitivitást mutatott és nem mutatott szalicilát szenzitivitást. Ugyanakkor a presztin-mediált sejtrövidülés mikro- ill. milliszekundumos időtartományba eső folyamat, míg az általunk leírt sejtválasz 30-60 másodperces időtartományba esik. Emellett a mikrodeformációhoz kötött sejtválasz Ca^{2+} függő, szemben a presztin Ca^{2+} független működésével. Ezek alapján egyértelműen kizárhatjuk a presztinhez kötött sejtválasz szerepét a folyamatban.

A mechanizmus, mely magyarázhatja az eredményeinket, az ún. membrán görbület változási modellel egyeztethető össze (membran bending model) melyben a kortikális rácsozat két pillérfehérje között ívelő sejtmembrán és közöttük feszülő aktin filamentumok alkotják az elemi motoros és rugalmas egységeket, s ahol a membránde polarizáció sejt-

⁴A sejteket alkotó identikus, azonos Young modulusú hengerszeletek hossza a hosszabb sejtek esetében megnő, így axiális merevségük kisebb lesz, ennek megfelelően az összegződésükből kialakult tengelyirányú sejt merevség is lecsökken a rövidebb sejtekhez képest.

összehúzódást, a hyperpolarizáció megnyúlást okoz.

Mint tudjuk, a külső szőrsejtek membránjában vannak olyan nem-szelektív kation csatornák, melyek képesek depolarizációt létrehozni következményes lassú szőrsejtösszehúzódással. Kísérleti elrendezésünkben az oldalfal feszülése hasonló csatornák megnyílását idézheti elő. Ezt támasztja alá, hogy a lanthanoida csoportba tartozó gadolinium, mely közismerten gátolja a feszülés-aktivált csatornákat, gátolta a mikropipettán alkalmazott negatív nyomás által kiváltott lassú szőrsejtmozgást és az oldalfal aktív viselkedését. Takahashi és Santos-Sacchi (2001) mikromechanikai stressz indukált, lanthanoidákkal részlegesen gátolható ionáramokat írt le külső szőrsejtben. Ezek az áramok a sejtközépi régióban a legnagyobbak, a sejt két pólusa felé pedig csökkennek, mely jól illeszkedik azon megfigyelésünkhöz, miszerint a ΔL - ΔT görbéken látható aktív komponens a sejtközépi régióban nagyobb, mint a sejtpólusok környékén, és a gadolinium kezelés csökkenti az aktivitást, de nem oltja ki teljesen azt.

További magyarázat lehet az általunk leírt jelenségre a sejtmembrán vagy a kortikális rácsozat fehérjéinek kalcium függő metabolikus módosulása (foszforiláció-defoszforiláció), mely képes megváltoztatni a sejtfal merevségét. Minamino és mtsai. (1998) a külső szőrsejtek elektromos térerővel indukált tetanizálása után megjelenő lassú mozgását vizsgálva azt találták, hogy a sejtösszehúzódás 20-30 másodperccel a stimuláció után jelentkezett és ezt követően 1-2 percig tartott, hasonlóan a mikropipettán keresztül történő negatív nyomás alkalmazását követően kialakult válaszhoz. A Ca^{2+} -calmodulin-CAM kináz útvonal blokkolása, a lassú mozgás gátlását eredményezte, hasonlóan az általunk kalcium megvonás után észlelt sejtaktivitás csökkenéshez. Mindez egy Ca^{2+} -calmodulin-CAM kináz függő sejtösszehúzódási mechanizmus jelenlétére utal. Kísérleteink azt mutatják, hogy mind a kalcium megvonás, mind a Gd^{3+} extracelluláris jelenléte által létrehozott szelektív kationcsatorna gátlás jelentős oldalfal-merevség növekedést okoz. Így mindamellet, hogy feltételezünk egy Ca^{2+} -függő sejtösszehúzódási mechanizmust nem szabad megfeledkeznünk arról, hogy az oldalfal merevségének fokozódása is jelentősen hozzájárulhat a sejtválasz csökkenéshez ezekben az esetekben. Az oldalfal merevségének Ca^{2+} -függéséért felelős folyamat még nem tisztázott, de felmerül egy Ca^{2+} -calmodulin-protein foszfatáz útvonal szerepe a szabályozásban (Batta és mtsai nem közölt adatok).

Munkánk során sikerült modellezni a külső szőrsejtek oldalfalának mikropipettán keresztül közvetített negatív nyomásra adott válaszát, mely egy passzív és egy aktív komponest tárt fel. A kísérleti adatok azt mutatják, hogy a pipettába behúzódnó sejtfalrészlet hosszának időfüggvénye exponenciális összefüggést követ, mely az oldalfalat alkotó struktúrelemek által létrehozott két állapotú rugalmas egység eloszlásfüggvényével modellez-

hető. Ennek megfelelően elmondhatjuk, hogy a külső szőrsejtek oldalfalának rugalmas alakváltozásai nem írhatók le a korábban használt egyszerű rugalmas alakváltozásként, a sejtfal komplex felépítése egyben annak komplex mechanikai viselkedését is jelenti. A fenti két állapotú modell kiterjeszthető a sejtek szupranukleáris régióiban észlelt aktív sejtfal válaszára is, mindazonáltal még nem tekinthetjük ismertnek a kontraktilis egységek strukturális alapjait. A kísérleti eredményeknek a modellre való jó illeszkedése azonban előre vetíti ilyen, feszülés-receptor modulált egységek meglétét. A külső szőrsejtek szinaptikus régiójában a sejtszerkezeti különbségek miatt nincsenek a sejtmag fölötti sejtrégiókban megtalálható mikromechanikai egységekhez hasonló struktúrák, mindazonáltal a sejtfal passzív viselkedése mind a mag fölötti, mind a szinaptikus régióban hasonló. Elgondolásunk szerint a külső szőrsejtek plazmamebránjában megtalálható alkotók (koleszterin, fehérjék) nem csak merevebbé teszik azt, hanem képesek kvázi-elasztikus egységeket létrehozni, melyek kialakításában a szubszinaptikus ciszternális rendszer is részt vesz. Ezek a kvázi-elasztikus egységek lehetnek felelősek a szinaptikus régió oldalfalának az említett, összetett modellel leírható viselkedéséért.

Összegezve, a külső szőrsejtek oldalfalának merevsége aktív szabályozás alatt áll, mely szoros kapcsolatban van a sejtfal-feszülés indukálta lassú sejtmozgással. Ez a folyamat megváltoztatva a külső szőrsejtek oldalfalmerevségét és sejhosszát, olyan szabályozási lehetőséget biztosít, mely a szőrsejtek mechanikai sajátságainak a megváltoztatásával képes szabályozni mind az elektromotilitást mind az elektromotilitás effektivitását a membrana basillárisra történő energiavisszacsatolásban. A szabályozó folyamatban Ca^{2+} és feszülés kapuzott ioncsatornák szerepét sikerült bizonyítani, mely mögött Ca^{2+} -dependens foszforilációs-defoszforilációs útvonalak állhatnak, ami előre vetíti ennek az elektromotilitás-független intrinzik szabályozó rendszernek az efferens neurotranszmitterek általi szabályozhatóságát.

A külső szőrsejtek efferens beidegzése szabályozza a cochleáris erősítés hatékonyságát, fontos részét képezve a az emlős cochlea adaptációjának és a tartós zaj elleni védelmének. Az efferens idegvégződésekből felszabaduló ACh és GABA receptorai tonotopikus eloszlást mutatnak a cochleán belül. Ezzel összhangban a cochlea csúcsi kanyarulatból izolált sejtekhez kötődő GABA és a cochlea bazális kanyarulatából izolált sejtekhez kötődő ACh hatást észleltünk az oldalfalmerevségben és annak szabályozásában. Mindkét neurotranszmitter jellegzetes hatása az oldalfal merevségének csökkentése és a feszesség beállító sejt-válasz serkentése, valamint a mikrodeformáció keltette lassú sejttrövidülés fokozása volt.

Dallos és mtsai (1997) felvetették, hogy a külső szőrsejtek elektromotilitásának ACh hatására bekövetkező amplitudó növekedése a külső szőrsejtek tengelyirányú merevség-

csökkenésének következtében jön létre. Hasonló összefüggés merül fel a külső szőrsejtek oldalfalmerevsége, a feszesség beállító sejtválasz és mikrodeformáció keltette lassú sejt-rövidülés között: az efferens neurotranszmitter-mediált oldalfalmerevség csökkenés fokozza az aktív sejtválaszokat (feszülés beállító sejtválasz és mikrodeformáció keltette lassú sejt-rövidülés).

Az ACh sejtmerevségre és elektromotilitásra gyakorolt hatásának kialakításában a kalcium másodlagos hírvivőként betöltött szerepe már korábban is ismert volt. Az ACh nagy áteresztőképességű kation-szelektív csatornákat (un. α_9/α_{10} ACh-receptor) nyit a külső szőrsejtek szinaptikus régiójában. Az így kialakult Ca^{2+} -influx a szubszinaptikus ill. a felszín alatti ciszternális rendszerből (ryadonin receptor és inositol triszfoszfát vezérelt csatornák) másodlagos Ca^{2+} felszabadulást hoz létre (Ca^{2+} indukálta Ca^{2+} felszabadulás). Az így kialakult Ca^{2+} jel nyomán Ca^{2+} -kalmodulin függő protein kináz (CaMKII, CaMKIV), protein kináz C, cGMP ill. cAMP függő protein kináz útvonalak aktiválódnak, mely eredményeként a citoszkeleton ill. a presztin foszforilációjához vezet. Ezt bizonyítja a külső Ca^{2+} koncentráció és az oldalfalmerevség valamint a feszesség beállító sejtválasz közötti szoros kapcsolat is.

A GABA vonatkozásában bicuculline szenzitív GABA-mediált Ca^{2+} -szignalizációt írtak le Purkinje sejteken, ahol a GABA receptorokhoz kötődő feszültségfüggő Ca^{2+} csatornák megnyílása vezet a Ca^{2+} -jel kialakításához. A feszültségfüggő ioncsatornák megnyílásához szükséges membránpotenciál változás ebben az esetben a GABA receptor csatornán történő HCO_3^- kiáramlás következtében jön létre. Hasonló folyamat eredményeként jöhet létre az általunk észlelt GABA hatás a cochleoapikális külső szőrsejteken egy GABA-mediált Ca^{2+} -influx azonos folyamatokat hozhat létre a cochleoapikális sejtekben, mint egy ACh-mediált Ca^{2+} -influx a cochleobasális sejtekben. Ez magyarázhatja a különböző lokalizációjú sejtekhez kapcsolódó ACh és GABA hatás egyezőségét. Mindazonáltal különbségek is láthatók a két neurotranszmitter hatása között: az ACh hatása erősebb a cochleobasális lokalizációjú sejteken mint a GABA hatása a cochleoapikális sejteken minden vizsgált paraméter tekintetében, és a GABA eltérő módon befolyásolja az oldalfal merevségfüggő viselkedését (az oldalfal maximális megnyújthatósága, az oldalfal szegmens retrakciójának sebességi állandója) és a kapcsolódó lassú sejt-rövidülést mint az ACh. A Purkinje sejteken leírt mechanizmushoz hasonló folyamat ezeket a különbségeket is segíthet megmagyarázni. Az ACh receptorokhoz kötődő jelátvivő hatására közvetlen módon alakul ki Ca^{2+} -influx, míg a GABA esetében ez indirekt módon, a receptorhoz kötődő jelátvivő hatására létrejövő membránpotenciál változás által szabályozott módon alakul ki. Ennek eredményeként a GABA-mediált Ca^{2+} -influx ill. Ca^{2+} -szignalizáció nagysága el-

marad az ACh-mediálthoz képest. Ugyanakkor Kalinec és munkatársai (2000) a külső szőrsejtek motilitásának (gyors és lassú motilitás) ACh által való szabályozásában GTP-ázok szerepét írták le. Az ACh receptor aktiválódása eddig pontosan nem ismert módon különböző GTP-áz útvonalakat (Rho, Cdc42, Rac1) aktivál, mely lehetőséget teremt alternatív ill. párhuzamos szabályozási folyamatok elindulására is. Ezt látszik erősíteni az ACh és a GABA külső Ca^{2+} megvonása mellett észlelt effektivitása. Mint korábban láttuk, a külső szőrsejtek Ca^{2+} -mentes környezetben való tartása az oldalfal merevségének jelentős emelkedését eredményezte (46%), mely mellett az aktív feszesség beállító sejtválasz lényegében eltűnt. A cochlea bazális kanyarulatából izolált, Ca^{2+} -mentes környezetbe helyezett külső szőrsejtek ACh jelenlétében kisebb mértékű oldalfalmerevség növekedéssel reagáltak, mely mellett a feszesség beállító sejtválasz megtartott maradt, jóllehet kisebb amplitúddal. Hasonló eredmény adódott a cochlea csúcsáról izolált sejtek esetében, GABA jelenléte mellett.

Az intracelluláris Ca^{2+} szint emelkedésének ill. alternatív szignalizációs útvonalak aktivációjának egyik lehetséges következménye a citoszkeletális fehérjék és a presztin foszforilációja. Ezt erősíti meg a mérési adatokból kalkulált viszkozitási együttható emelkedése is Ca^{2+} -mentes környezetben ill. Gd^{3+} jelenlétében (2. táblázat), valamint az is, hogy nincs szignifikáns különbség az ACh és GABA passzív merevségi mutatókra gyakorolt hatásában.

Az eddigi eredményeink alapján úgy tűnik, hogy az efferens beidegzés magas intenzitású hanghatással szembeni védőhatása és a cochlea adaptációjának segítése nem a sejtformamerevség közvetlen szabályozása útján, hanem indirekt úton, a mikrodeformáció hatására létrejövő sejtformafeszülés (stretch) által keltett sejtösszehúzódás és oldalfalmerevség fokozódás felerősítése útján valósul meg. Egy erős hanghatás következtében a membrana basilarison nagyobb amplitúdójú kilengések alakulnak ki, melyek nagyobb fizikai feszülést (stretch) hoznak létre a külső szőrsejtek oldalfalában, lassú -kvázi statikus- sejt-rövidülést eredményezve. Az efferens neurotranszmitterek jelenlétében kialakult csökkent oldalfalmerevség és a külső szőrsejtek következményes motilis képesség fokozódása képes potenciálni az oldalfalfeszülés indukálta sejt-rövidülést. A sejt-rövidülés fokozza az oldalfal merevségét és az így létrejött sejt-hossz és sejtformamerevség változás mértéke elegendő lehet, hogy megváltoztassa a cochlea mikromechanikai tulajdonságait és ellensúlyozza a magas intenzitású hanghatás nyomán a Corti szervben kialakuló disztorziót.

Összegzésként elmondhajtuk, hogy az efferens neurotranszmitterek fokozzák a külső szőrsejtek mechanikai behatásra adott válaszkészségét, mely egy erőteljes, presztin-független sejt-rövidülésben nyilvánul meg, fokozva a sejt merevségét. Ezek a változások elegendőek

lehetnek arra, hogy megváltoztassák a Corti szerv mechanikai tulajdonságait, csillapítva ezzel a membrana basilaris kitéréseit, így védve ezzel a cochleát a magas intenzitású hanghatások ellen. Mindez jól illeszkedik Friedberger és mtsai (1998) által tengerimalacon leírt jelenséghez, miszerint zajhatásra dinamikus Corti-szerv kontrakció alakult ki, melyet a külső szőrsejtek intracelluláris Ca^{2+} koncentrációjának emelkedése kísért.

Az eredményeink lehetőséget nyitnak arra, hogy pontosabban megértsük a külső szőrsejtek membrana basilarisra történő energiavisszacsatolásának szabályozását, a belsőfül adaptációs, automatikus hangerő szabályozó és protektív folyamatait.

A téziseket megalapozó tudományos munkák jegyzéke

Közlemények

1. Batta J.T., Panyi Gy., Gáspár R., Sziklai I. Active and passive behaviour in the regulation of stiffness of the lateral wall in outer hair cells of the guinea pig. Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol. 447:328-336, 2003. [IF.:2]
2. Batta J.T., Panyi Gy., Szűcs A., Sziklai I. Regulation of the lateral wall stiffness by acetylcholine and GABA in the outer hair cells of the guinea pig. Eur. J. Neurosci. in press 2004. [IF.:3,8]
3. Batta J.T., Panyi Gy., Gáspár R., Sziklai I. Tengerimalac cochleából izolált külső szőrsejtek oldalfalmerevségének aktív szabályozása, mint a cochlearis erősítő része.

Fül-,Orr-,Gégegyógyászat 50:133-141, 2004.

Idézhető kivonatok

1. Batta J.T., Panyi Gy., Sziklai I. Control of the lateral wall stiffness by efferent neurotransmitters in the OHCs. Acta Oto-Rhyno-Laryng. Belg. 56:287b, 2002.
2. Farkas Zs., Batta J.T., Sziklai I. Extracellular potassium concentration-related lateral wall stiffness in outer hair cells. Acta Oto-Rhyno-Laryng. Belg. 56:305a, 2002.
3. Batta J.T., Panyi Gy., Szűcs A., Sziklai I. Regulatory stiffness response of the OHC lateral wall is regulated by acetylcholine and GABA. Otorhinolaryngol Hung. 50:195b, 2004.
4. Borkó R., Batta J.T., Sziklai I. Correlation between slow motility, fast motility and lateral wall stiffness in the outer hair cells of the guinea-pig. Otorhinolaryngol Hung. 50:199a, 2004.

Előadások, poszterek

1. Batta J.T., Panyi Gy., Sziklai I. Comparison of membrane stiffness in cochleoapical and cochleobasal outer hair cells of the guinea pig. Inner Ear Biology Workshop, Róma. 1-4 09. 2001.
2. Batta J.T., Panyi Gy., Sziklai I. Control of the lateral wall stiffness by efferent neurotransmitters in the OHCs. Inner Ear Biology Workshop, Liege, 08-10 09.2002.
3. Farkas Zs., Batta J.T., Sziklai I. Extracellular potassium concentration-related lateral wall stiffness in outer hair cells. Inner Ear Biology Workshop, Liege, 08-10 09.2002.
4. Batta J.T., Panyi Gy., Sziklai I. Influence of efferent neurotransmitters upon slow and fast motility in isolated OHCs. Association for Research in Otolaryngology, Florida, USA, 2004.
5. Batta J.T., Panyi Gy., Gáspár R., Sziklai I. Emlős cochleából izolált külső szőrsejtek oldalfal-merevségének szabályozása és ennek szerepe a cochleáris erősítő rendszerben. Magyar Fül-Orr-Gégeorvosok Egyesületének Kongresszusa, Sopron, 26-29 05.2004.

6. Borkó R., Batta J.T., Sziklai I. Lassú sejthosszváltozás, oldalfalmerevség és elektromotilitás tengerimalac izolált külső szőrsejteken. Magyar Fül-Orr-Gégeorvosok Egyesülete Audiológiai Szekció Vándorgyűlése, Debrecen, 1-3 09.2004.
7. Batta J.T., Panyi Gy., Szűcs A., Sziklai I. Regulatory stiffness response of the OHC lateral wall is regulated by acetylcholine and GABA. Inner Ear Biology Workshop, Debrecen, 5-7 09.2004.
8. Borkó R., Batta J.T., Sziklai I. Correlation between slow motility, fast motility and lateral wall stiffness in the outer hair cells of the guinea-pig. Inner Ear Biology Workshop, Debrecen, 5-7 09.2004.

További közlemények, melyek összefüggenek a tézisekkel

1. Borkó R., Batta J.T., Sziklai I. Electromotile performance of isolated outer hair cells during slow motile shortening. Acta Otolaryng. in press 2005. [IF.: 0,8]
2. Borkó R., Batta J.T., Sziklai I. Slow motility, fast motility and lateral wall stiffness in the outer hair cells of the guinea pig. Hear. Res. under publication 2005. [IF.:1,5]